

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07372

研究課題名(和文) 組織における遺伝子座特異的な単一細胞クロマチン解析法の基盤技術の確立

研究課題名(英文) Development of locus-specific single cell analysis of chromatin modifications in tissue

研究代表者

西山 晃 (NISHIYAMA, Akira)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：80589664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、マウス生体において転写制御領域を解析するために必須である、極微量サンプルからの遺伝子発現、ヒストン修飾、高解像度でのクロマチン構造を解析する技術を確立した。遺伝子発現では、mRNAや全RNAを対象としたRNA-seqを実施した。ヒストン修飾解析では、私たちが確立した微量ChIP-seq法よりも少数の細胞で解析できる手法を導入した。またHi-C法にキャプチャープローブを組合せて、高解像度でのクロマチン構造解析が可能となった。本来の目的であった単一細胞エピゲノム解析手法の確立は達成できなかったが、これらの解析技術によってマウス生体由来での転写制御領域の高精度解析が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個体発生や臓器の形成はもちろんのこと、様々な疾患における病態理解においては、遺伝子発現がどのように調節されているか、またどのような異常が生じているかを研究することが非常に重要です。しかし、生体由来の微量サンプルでは遺伝子発現、ヒストン修飾などのエピゲノム情報、高解像度のクロマチン高次構造の解析は困難でした。本研究では、生体由来の微量サンプルを用いて、高精細にこれらの解析を行う技術を確立しました。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established methods for analyzing gene expression, histone modifications, and chromatin structure at high resolution from very small number of cells. These methods are essential for analyzing transcriptional regulatory regions in the mouse tissues. For gene expression analysis, we performed RNA-seq for full length mRNA and total RNA. For histone modification analysis, we introduced methods for a smaller number of cells than our ChIP-seq method optimized for small amount of cells. In addition, we have combined the Hi-C method with capture probes to enable high-resolution chromatin structure analysis. Although we did not achieve the initial goal of establishing a method for single-cell epigenome analysis, these methods enable the high-precision analysis of transcriptional regulatory regions in mouse tissue.

研究分野：血液学

キーワード：エピゲノム ヒストン修飾 トランスクリプトーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一見均質に見える細胞集団においても遺伝子発現の不均質性が存在する。この不均質性は細胞の運命決定やがん細胞の転移性・薬剤耐性と密接に関係することが明らかになりつつある。遺伝子発現の不均質性の主因はエピゲノムの不均質性であることは疑いもなく、またエピゲノムの不均質性を引き起こす要因の一つとして微小環境を含む組織環境が挙げられる。しかし、転写因子の DNA 結合やヒストン修飾などのクロマチンを単一細胞かつ遺伝子座レベルで解析することは容易ではなく、また組織内のエピゲノムの不均質性を解析する技術も開発されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、生体組織内での不均一性を理解するために、極少数の細胞群を対象としたエピゲノム解析を行なった。本研究課題の当初の目的は、シングルセルレベルでのエピゲノム解析手法の確立であったが、この課題の基盤となる技術やデータとなる生体組織での転写制御領域解析の重要性が非常に高くなった。このため、マウス生体由来の極少数の細胞を用いてトランスクリプトーム、エピゲノムのマルチオミックス解析を行なった。

3. 研究の方法

(1) マウスからの細胞の調整

マウス骨髄ならびに脾臓から血球前駆細胞や成熟血球細胞を調整した。各細胞集団は BD 社 FACS Aria II を用いて、高純度に精製した。

(2) クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法

これまでに私たちが確立した微量サンプルでの ChIP 法を用いた ①。抗体は、活性化エンハンサーのマーカである K27 アセチル化ヒストン H3 (H3K27ac) に対する抗体を用いた。

(3) CUT&Tag 法

Henikoff らの開発した CUT&Tag 法を改良して用いた ②。抗体は、H3K27ac に対する抗体に加え、抑制性のマーカである K27 トリメチル化ヒストン H3 (H3K27me3) に対する抗体を用いた。

(4) RNA シーケンス (RNA-seq) 法

mRNA を対象とした RNA-seq 法には、SMART-seq 法 (タカラバイオ) を用いた。全 RNA を対象とした解析には、RamDA-seq 法を用いた ③。

(5) ATAC-seq 法によるオープンクロマチン解析

オープンクロマチン解析には Corces らの FAST-ATAC 法を改良して用いた ④。

(6) クロマチン高次構造解析

In situ Hi-C 法は、Rao らの手法を改良して用いた ⑤。合成キャプチャープローブ (アジレントテクノロジー) を用いて Hi-C ライブラリーの濃縮を行なった。

(7) 次世代シーケンス解析

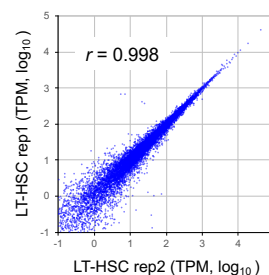
イルミナ社 NextSeq500 を用いてシーケンスを実施した。得られたシーケンスはナベインターナショナル社製解析サーバーを用いてデータ解析を行った。

4. 研究成果

(1) 生体由来の微量サンプルでのトランスクリプトーム解析

まず生体由来の微量サンプルを用いて遺伝子発現解析を行なった。約 1500 個の造血幹細胞で mRNA を対象とした RNA-seq を行なった結果、約 1 万 3000 個の遺伝子が検出されたのに加えて、 10^5 以上のダイナミックレンジと、2 個の biological replicate 間で非常に高い相関が得られた (第 1 図) ⑥。さらに、本法では mRNA 全長が検出された (第 2 図)。この検出された遺伝子数とダイナミックレンジの広さ、mRNA 全長の検出はシングルセル解析では得られないものである。このように、本解析方法は最新の技術ではないが重要な解析技術であり、得られるデータはシングルセル解析データを補完できるものである。

近年、非コード RNA の重要性が明らかになりつつある。私たちは mRNA-seq と同様に微量サンプルでの完全長トータル RNA 解析を試みた (第 2 図)。上記の mRNA シーケンスと比較して、イントロン由来 RNA

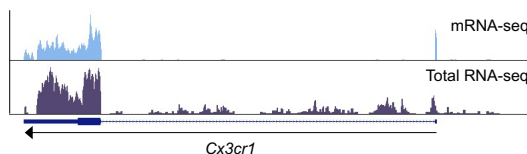


第 1 図 造血幹細胞を用いた RNA-seq 解析

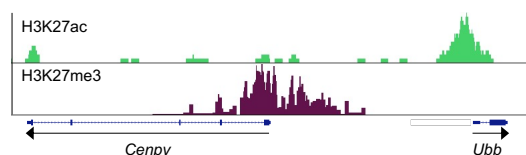
が検出されており、これに加えて転写開始点の5'上流領域の非コードRNAが検出された。この様に本法は非コードRNAの検出に最適であり、本データを用いて血球細胞分化で特異的に発現する非コードRNAの解析を進める予定である。

(2) 微量サンプルでのヒストン修飾解析

エピゲノム解析では、私たちはこれまでChIPシーケンスによってヒストン修飾や転写因子のゲノムワイド解析を進めてきた①、⑥。この技術はChIP自体の手法を詳細に見直すことで、約5万個の細胞で各種ヒストン修飾の解析が、約10万個の細胞で転写因子の解析が可能になったものである①。しかし、生体内には、数万個の細胞を得ることが困難な極少数の細胞集団が存在する。このような微量サンプルでのヒストン修飾の解析を行うために、Henikoffらの開発したCUT&Tag法の導入を試みた②。このCUT&Tag法の導入によって、数千個という非常に少ない細胞数でのヒストン修飾が可能となった(第3図)。今後は、転写因子や転写調節因子などの解析へと応用を進める予定である。



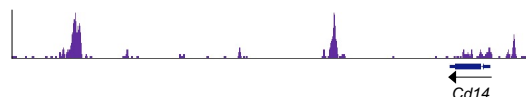
第2図 mRNA-seqと完全長トータルRNA-seqの例(Cx3cr1遺伝子)



第3図 CUT&Tag法によるヒストン修飾解析(Cenpv遺伝子、Ubb遺伝子)

(3) 微量サンプルでのオープンクロマチン解析

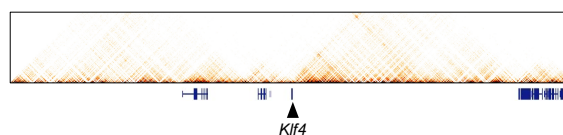
ヒストン修飾に加え、エピゲノム解析の一つとしてオープンクロマチン解析を行なった。FAST-ATAC法を用いることで、CUT&Tag法と同様に数千個の細胞でオープンクロマチン解析が可能となった。細胞種間で違いはあるが、概ね1万~4万箇所のオープンクロマチン領域が同定できた(第4図)。これらのエピゲノム解析を組み合わせることで転写因子モチーフの詳細な解析が可能になる。



第4図 ATAC-seqによるオープンクロマチン解析(Cd14遺伝子)

(4) 微量サンプルでのクロマチン高次構造解析

ヒストン修飾の解析によって遠位エンハンサーなど転写制御領域のゲノムワイドの解析が可能になる。一方、エンハンサー数は遺伝子数よりもはるかに多く、どのエンハンサーが遺伝子発現を制御するかを明らかにする必要がある。このために、私たちは微量サンプルでの高解像度のクロマチン高次構造解析を試みた。クロマチン高次構造での解像度については、Raoらによって改良されたin situ Hi-C法では従来のHi-C法よりも解像度が向上した。しかしながら改良されたHi-C解析でも数億リードのシーケンスデータでは解像度は100 kb以上であり、エンハンサーと遺伝子の相互作用を解析するには数十億リードという大規模なシーケンスが必要であった。私たちは、Hi-CライブラリーをRNAプロープで濃縮することで、シーケンス規模を拡大せずに解像度の向上を試みた。このRNAプロープは、Klf4遺伝子を中心に3 MBの領域で設計した。ゲノムワイドの解析ではないが、2 kbという非常に高い解像度での解析が可能となった(第5図)。



第5図 高解像クロマチン高次構造解析の例(Klf4遺伝子)

(5) 今後の解析について

本研究によりマウス生体由来からの微量サンプルでの遺伝子発現解析(mRNAと全RNAの双方の完全長解析)、ヒストン修飾やオープンクロマチン解析、高解像クロマチン高次構造解析の技術的基盤を確立することができた。当初の目的であったシングルセルレベルでのエピゲノム解析手法の確立は達成できなかったが、これらの技術が今後の礎になると期待される。

<引用文献>

- ① Kurotaki D et al. Cell Rep. 22(10), 2018, 2628-2641
- ② Kaya-Okur HS et al. Nat Commun. 10(1), 2019, 1930
- ③ Hayashi T et al. Nat Commun. 9(1), 2018, 619
- ④ Corces et al. Nat Genet. 48(10), 2016, 1193-1203
- ⑤ Rao SS et al. Cell. 159(7), 2014, 1665-1680
- ⑥ Murakami et al. Nat Immunol. 22(3), 2021, 301-311

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Konishi Hiroyuki, Okamoto Takayuki, Hara Yuichiro, Komine Okiru, Tamada Hiromi, Maeda Mitsuyo, Osako Fumika, Kobayashi Masaaki, Nishiyama Akira, Kataoka Yosky, Takai Toshiyuki, Udagawa Nobuyuki, Jung Steffen, Ozato Keiko, Tamura Tomohiko, Tsuda Makoto, Yamanaka Koji, Ogi Tomoo, Sato Katsuaki, Kiyama Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Astrocytic phagocytosis is a compensatory mechanism for microglial dysfunction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e104464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020104464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Murakami Koichi, Sasaki Haruka, Nishiyama Akira, Kurotaki Daisuke, Kawase Wataru, Ban Tatsuma, Nakabayashi Jun, Kanzaki Satoko, Sekita Yoichi, Nakajima Hideaki, Ozato Keiko, Kimura Tohru, Tamura Tomohiko	4. 巻 22
2. 論文標題 A RUNX-CBF -driven enhancer directs the Irf8 dose-dependent lineage choice between DCs and monocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 301 ~ 311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-021-00871-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ban Tatsuma, Kikuchi Masako, Sato Go, Manabe Akio, Tagata Noriko, Harita Kayo, Nishiyama Akira, (他7名), Ito Masashi, Tsukahara Kappei, Yoshimatsu Kentaro, Yamamoto Tadashi, Taniguchi Tadatsugu, Nakajima Hideaki, Ito Shuichi, Tamura Tomohiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Genetic and chemical inhibition of IRF5 suppresses pre-existing mouse lupus-like disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24609-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harada Ibuki, Sasaki Haruka, Murakami Koichi, Nishiyama Akira, Nakabayashi Jun, Ichino Motohide, Miyazaki Takuya, Kumagai Ken, Matsumoto Kenji, Hagihara Maki, Kawase Wataru, Tachibana Takayoshi, Tanaka Masatsugu, Saito Tomoyuki, Kanamori Heiwa, Fujita Hiroyuki, Fujisawa Shin, Nakajima Hideaki, Tamura Tomohiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Compromised anti-tumor-immune features of myeloid cell components in chronic myeloid leukemia patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97371-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 西山 晃
2. 発表標題 Introduction to the integrated analysis of epigenome and transcriptome with low cell numbers.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山 晃、村上 紘一、佐々木 悠、関田 洋一、木村 透、田村 智彦
2. 発表標題 RUNX-CBF によって駆動されるIrf8 エンハンサーが単球か樹状細胞かの系譜選択を決定する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Nishiyama
2. 発表標題 Transcriptional regulation of mononuclear phagocyte development by the transcription factor IRF8
3. 学会等名 2022 JSPS-NIH Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

免疫学教室 | 横浜市立大学
<https://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~immunol/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------